

## BRIDGED HYALURONIC ACID GEL, COMPOSITION AND MANUFACTURE

**Patent number:** JP61138601  
**Publication date:** 1986-06-26  
**Inventor:** ENDORE EE BORAAZU; ADORUFU RESHISHINAA  
**Applicant:** BIOMATRIX INC

**Classification:**




**- International:** A61K31/00; A61K8/02; A61K8/20; A61K8/23;  
A61K8/24; A61K8/25; A61K8/31; A61K8/35; A61K8/36;  
A61K8/46; A61K8/64; A61K8/65; A61K8/72; A61K8/73;  
A61K8/81; A61K8/92; A61K8/97; A61K8/98; A61K9/00;  
A61K9/06; A61K31/715; A61K47/36; A61P43/00;  
A61Q19/00; C08B37/08; C08F8/34; C08L1/00;  
C08L1/08; C08L5/00; C08L5/08; C08L89/00;  
C08L91/00; C09K3/00; A61K31/00; A61K8/02;  
A61K8/19; A61K8/30; A61K8/72; A61K8/92; A61K8/96;  
A61K9/00; A61K9/06; A61K31/715; A61K47/36;  
A61P43/00; A61Q19/00; C08B37/00; C08F8/00;  
C08L1/00; C08L5/00; C08L89/00; C08L91/00;  
C09K3/00; (IPC1-7): A61K7/00; A61K9/00; A61K47/00;  
C08B37/00; C08B37/08

**- european:** A61K8/73; A61K8/73C; A61K8/73L; A61K47/36;  
A61Q19/00; C08B37/00P2F; C08F8/34; C08L5/08

**Application number:** JP19850147612 19850704

**Priority number(s):** US19840678895 19841206

**Also published as:**

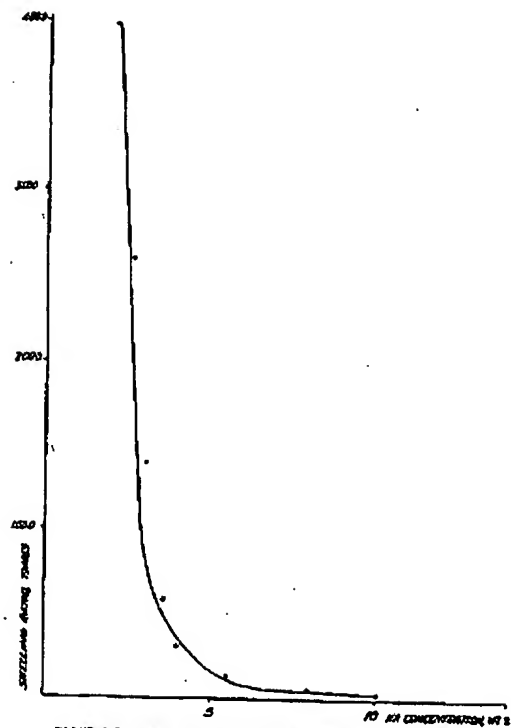
 US4582865 (A1)  
 JP2138346 (A)  
 GB2205848 (A)  
 GB2181148 (A)  
 GB2181147 (A)

more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP61138601  
Abstract of correspondent: **US4582865**

Disclosed are cross-linked gels of hyaluronic acid, alone or mixed with other hydrophilic polymers and containing various substances or covalently bonded low molecular weight substances and processes for preparing them. These products are useful in numerous applications including cosmetic formulations and as drug delivery systems.



EXAMPLE 3. SWELLING RATIO OF CROSS-LINKED NA GELS AT  
DIFFERENT CONCENTRATIONS OF NA IN SWELLING SOLUTIONS  
(GELS W/OUT SWOP ABOUT 1:1, ROOM TEMPERATURE, 1 HOUR).

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭61-138601

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和61年(1986)6月26日

C 08 B 37/00

7133-4C

A 61 K 7/00

7306-4C

9/00

6742-4C

47/00

6742-4C

C 08 B 37/08

7133-4C

審査請求 未請求 発明の数 9 (全14頁)

⑮ 発明の名称 架橋ヒアルロン酸ゲル、その組成物及び製造法

⑯ 特 願 昭60-147612

⑰ 出 願 昭60(1985)7月4日

優先権主張 ⑱ 1984年12月6日 ⑲ 米国(US) ⑳ 678895

㉑ 発 明 者 エンドレ エー・ボラ 米国、ニュージャージー 07024、エフ・ティ・リー、オールドベイリセイド・ロード 200

㉒ 発 明 者 アドルフ レシシナー 米国、ニュージャージー 07022、フェアビュー、プロスペクト・アベニュー 623

㉓ 出 願 人 バイオマトリックス、 米国、ニュージャージー 07657、リッジフィールド、レインコーポレイテッド ールロード・アベニュー 65

㉔ 代 理 人 弁理士 野河 信太郎

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

架橋ヒアルロン酸ゲル、その組成物及び製造法

## 2. 特許請求の範囲

1. pHが約9以上の希アルカリ水溶液中約20℃でヒアルロン酸またはその塩をジビニルスルホンとの架橋反応に付すことを特徴とする架橋ヒアルロン酸ゲルの製造法。

2. ヒアルロン酸またはその塩が分子量約50,000～ $8 \times 10^6$ である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

3. 反応混合物中のヒアルロン酸またはその塩の濃度が1～8重量%である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

4. ヒアルロン酸またはその塩とジビニルスルホンとの重量比が15:1～1:5である特許請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 反応混合物にさらに塩酸、硫酸、リン酸または酢酸のそれぞれのアルカリ金属塩を、約20重

量%になるまで十分に添加することからなる特許請求の範囲第1項に記載の方法。

6. ヒアルロン酸またはその塩と、ジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1とつの混合物を、pH約9以上の希アルカリ水溶液中、約20℃でジビニルスルホンを架橋反応に付し、ヒアルロン酸と他の親水性ポリマーの混合架橋ゲルを得ることを特徴とする混合架橋ヒアルロン酸ゲルの製造法。

7. 他の親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、キサンテンゴム、コンドロイチン硫酸塩、ヘパリンからなる群から選ばれた天然または合成の多糖類、またはコラーゲン、エラスチン、アルブミン、グロブリン、ケラチン硫酸塩、硫酸アミノグリコサミノグリカンからなる群から選択される蛋白質、または合成の水溶性ポリマーである特許請求の範囲第6項に記載の方法。

8. ヒアルロン酸またはその塩が、分子量約50,000～ $8 \times 10^6$ である特許請求の範囲第6項に

記載の方法。

9. 反応混合物におけるヒアルロン酸またはその塩と前記他の親水性ポリマーとの合計濃度が 1 ~ 8 重量%で、ヒアルロン酸またはその塩が、ヒアルロン酸またはその塩と前記他の親水性ポリマーとの合計量の 5 ~ 95 重量%である特許請求の範囲第 6 項に記載の方法。

10. ヒアルロン酸またはその塩とジビニルスルホンとの重量比が 15:1 ~ 1:5 である特許請求の範囲第 6 項に記載の方法。

11. 反応混合物にさらに塩酸、硫酸、リン酸または酢酸のそれぞれのアルカリ金属塩を、約 20 重量%になるまで十分に添加することからなる特許請求の範囲第 6 項に記載の方法。

12. ヒアルロン酸もしくはその塩または、ヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも 1 つとの混合物の約 9 以上の希アルカリ水溶液中に、不活性の、水に不溶性の物質を添加し、常温でジビニルスルホンとの架橋反応に付

塩またはヒアルロン酸もしくはその塩とポリマーとに不活性の、水に不溶性の物質を合計した重量の 1 ~ 95 重量%含まれてなる特許請求の範囲第 12 項に記載の方法。

17. ヒアルロン酸またはその塩とジビニルスルホンとの重量比が 15:1 ~ 1:5 である特許請求の範囲第 12 項に記載の方法。

18. 反応混合物にさらに塩酸、硫酸、リン酸または酢酸のそれぞれのアルカリ金属塩を、約 20 重量%になるまで十分に添加することからなる特許請求の範囲第 12 項に記載の方法。

19. ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも 1 つとの混合物の約 9 以上の希アルカリ水溶液中に、ジビニルスルホンに対して反応性の活性水素原子を有する官能基をもつ低分子量物質を加え、約 20℃でジビニルスルホンとの架橋反応に付すことを特徴とする、上記ゲルの巨大分子網目構造に共有結合した低分子量物質を含有する、

すことを特徴とする、不活性の、水に不溶性の物質を含む架橋ヒアルロン酸ゲル、またはヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも 1 つとの混合物の混合架橋ゲルの製造法。

13. 不活性の、水に不溶性の物質が炭化水素、油または脂肪、顔料、ポリエチレンまたはポリテトラフルオロエチレンである特許請求の範囲第 12 項に記載の方法。

14. 炭化水素がワセリン、油または脂肪がみつろう、やし油またはラノリン、顔料がカオリン、酸化第二鉄または不溶性染料である特許請求の範囲の第 13 項に記載の方法。

15. ヒアルロン酸またはその塩が分子量約 50,000 ~  $8 \times 10^6$  である特許請求の範囲第 12 項に記載の方法。

16. ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩と他の親水性ポリマーとの混合物の濃度が 1 ~ 8 重量%であり、不活性の、水に不溶性の物質が、ヒアルロン酸もしくはその

架橋ヒアルロン酸ゲルまたはヒアルロン酸もしくはその塩と上記他の親水性ポリマーの少なくとも 1 つとの混合物の混合架橋ゲルの製造法。

20. 低分子量物質が医薬である特許請求の範囲第 19 項に記載の方法。

21. 低分子量物質がカルミン酸である特許請求の範囲第 19 項に記載の方法。

22. ヒアルロン酸またはその塩が分子量約 50,000 ~  $8 \times 10^6$  である特許請求の範囲第 19 項に記載の方法。

23. ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩と他の親水性ポリマーとの混合物の濃度が 1 ~ 8 重量%であり、低分子量物質が、ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩とポリマーとに低分子量物質を合計した重量の 1 ~ 95 重量%含まれてなる特許請求の範囲第 19 項に記載の方法。

24. ヒアルロン酸またはその塩とジビニルスルホンとの重量比が 15:1 ~ 1:5 である特許請求の範囲第 19 項に記載の方法。

25. 反応混合物にさらに塩酸、硫酸、リン酸または酢酸のそれぞれのアルカリ金属塩を、約20重量%になるまで十分に添加することからなる特許請求の範囲第19項に記載の方法。

26. pHが約9以上の希アルカリ水溶液中約20℃下、ヒアルロン酸またはその塩とジビニルスルホンとの架橋反応で得られた架橋ヒアルロン酸ゲル。

27. ヒアルロン酸またはその塩と、ジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つとの合計濃度が1~8重量%で、ヒアルロン酸またはその塩が、ヒアルロン酸またはその塩と上記他の親水性ポリマーとの合計重量に対し5~95重量%であるヒアルロン酸と上記親水性ポリマーとの混合架橋ゲル。

28. 他の親水性ポリマーがヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、キサンテンゴム、コンドロイチン硫酸塩、ヘパリンからなる群から選ばれた天然または合成の多糖類、またはコラーゲン、エラスチン、アルブミン、グロブリン、ケラチン硫酸塩、硫酸アミノグリコサミ

ノグリカンからなる群から選択される蛋白質、または合成の水溶性ポリマーである特許請求の範囲第27項に記載のゲル。

29. ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つとの混合物の濃度が1~8重量%であり、不活性の、水に不溶性の物質が、ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩とポリマーとに不活性の、水に不溶性の物質を合計した重量の1~95重量%含まれてなる架橋ヒアルロン酸ゲルまたはヒアルロン酸と上記他の親水性ポリマーとの混合架橋ゲル。

30. 不活性の、水に不溶性の物質が炭化水素、油または脂肪、顔料、ポリエチレンまたはポリテトラフルオロエチレンである特許請求の範囲第29項に記載のゲル。

31. 炭化水素がワセリン、油または脂肪がみつろう、やし油またはラノリン、顔料がカオリン、酸化第二鉄、または不溶性染料である特許請求の

範囲第30項に記載のゲル。

32. ヒアルロン酸もしくはその塩、またはヒアルロン酸もしくはその塩とジビニルスルホンと反応しうる官能基を有する他の親水性ポリマーの少なくとも1つとの混合物にさらに巨大網目分子構造に共有結合しうる低分子量物質を含有し、ヒアルロン酸もしくはその塩またはヒアルロン酸もしくはその塩と上記親水性ポリマーとの混合物の濃度が1~8重量%であり該低分子量物質を全高分子物質の1~95重量%含有する架橋ヒアルロン酸ゲルまたはヒアルロン酸と上記親水性ポリマーとからなる混合架橋ゲル。

33. 低分子量物質が医薬である特許請求の範囲第32項に記載のゲル。

34. 低分子量物質がカルミン酸である特許請求の範囲第32項に記載のゲル。

35. 生物学的もしくは薬学的活性を有する物質を分散しかつ制御された仕方で拡散しうる、架橋ヒアルロン酸ゲルまたはヒアルロン酸またはその塩と共重合しうる他の親水性ポリマーのうち少な

くとも1つとの混合架橋ゲルで形成された分子籠に生物学的もしくは薬学的活性を有する物質の放出組成物。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (イ) 産業上の利用分野

この発明はヒアルロン酸のゲル及びヒアルロン酸含有の混合ゲル、またそれらを含む配合物及びその製造法に関する。

#### (ロ) 従来の技術

ヒアルロン酸(HA)はN-アセチル-D-グルコサミンと単糖類のD-グルクロン酸が交互に $\beta$ -1,4結合し、形成された二糖類単位がさらに $\beta$ -1,3グリコシド結合した多糖類として天然に存在しよく知られている。HAは通常はそのナトリウム塩の形で存在する。一般にHAの分子量は50,000から $8 \times 10^6$ もしくはさらに高い範囲にある。

従来HAの架橋は、1,2,3,4-ジエポキシブタンのアルカリ溶液で50℃で処理することにより行なわれていた(T. C. ローラント、K. ヘルジ

ング及びB. ゲロッテ、アクタ ケミカ スカン  
ディナピカ (Acta Chem. Scand.) 18  
[1964], No. 1, 274-5)。この方法により得  
られる製品は水で大きく膨潤するゲルである。ま  
たジビニルスルホン（以下DVSとする）も多糖  
類とりわけセルロースの架橋剤としてよく知られ  
ている。（米国特許第 3,357,784号）。

#### （ハ）発明の構成

この発明は高膨潤性架橋ヒアルロン酸ゲルを提  
供するものである。

また、この発明はヒアルロン酸と他の親水性ポ  
リマーとの混合架橋ゲルを提供するものである。

また他に、この発明は他のいろいろな物質を充  
填した、ヒアルロン酸と他のポリマーとの架橋ゲ  
ルを提供するものである。

さらに他に、この発明はゲルの巨大分子構造に  
共有結合する低分子量物質を含む架橋ヒアルロン  
酸ゲルを提供するものである。

またさらに他に、この発明は架橋ヒアルロン酸  
ゲルを含むいろいろな配合物（組成物）を提供す

れる他の多糖類の架橋ゲルの膨潤率よりは十分に  
大きいことも見いだされた。このことは（他の多  
糖類と比較したときの）HAそれ自身の特性並び  
にその水溶液特性とによって説明されよう。発明  
者らは、水中で、大きいHA分子が、その溶液中  
で著しく大容積になり、非常に可塑性のある長い  
ランダムコイルを形成することを発見した。例え  
ば、生理食塩水中における水和したHAの比体積  
は約  $2 \sim 6 \times 10^3$  cc/g である。このことは、H  
Aの非常に低濃度の水溶液中では、溶液の物理化  
学特性ばかりでなく、さらにHAと他の低分子量  
物質との反応にも十分に影響を与える排除体積効  
果が生じることを意味している。換言すれば、H  
A溶液の性質は他の多糖類で観察されるものとは  
異なっており、架橋度や架橋ゲルの挙動に影響を与  
えるのである。

発明者らはまた次のことも発見した。すなわち  
高膨潤率のゲルを与えるHAのこの独特の性質は、  
HAと他の親水性ポリマーとの混合物とで製造さ  
れる架橋ゲルの性質を改質するのに使用すること

るものである。

最後に、この発明は、この発明の組成物の製造  
法を提供するものである。

この発明は、ジビニルスルホン（DVS）が室  
温すなわち約20℃の温度下でアルカリ水溶液中に  
おいてHAと容易に反応してHAの架橋ゲルを与  
えるという事実に基づいている。ここで使われて  
いるHAという語は、ヒアルロン酸及びそのナ  
トリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム  
などの塩を表わしている。これらのゲルは水また  
は水含有媒体中で膨潤する。膨潤率（swelling  
ratio）はゲルの架橋度に依存する。発明者等は  
HAの分子量、その反応混合液中での濃度、アル  
カリ濃度さらにポリマー/DVSの比などを含む  
いろいろの要因によって架橋度を制御できる事実  
を見出した。反応は非常に速く、たいていの場  
合開始数分後には強固なゲルが得られる。これら  
のゲルの膨潤率はその反応条件によるが20～  
8,000もしくはこれ以上のものである。

HA架橋ゲルの膨潤率は同じ反応条件下で得ら

ができるということである。上記親水性ポリマー  
とは、ヒドロキシセルロース、カルボキシメチル  
セルロース、キサンテンゴム、コンドロイチン硫  
酸塩、ヘパリンのような人工または合成の多糖類、  
コラーゲン、エラスチン、アルブミン、グロブリン  
などのようないろいろな各種の蛋白質、硫酸ケラ  
チン、硫酸アミノグリコサミノグリカンのような  
硫酸蛋白質、ポリビニルアルコールやその共重合  
体、ポリヒドロキシエチルメタクリレートの共重  
体などのような合成の水溶性ポリマー等である。  
換言すれば、水またはアルカリ水溶液に可溶性で  
あり、かつDVSと反応可能な基、すなわち、水  
酸基、アミノ基、スルフヒドリル基をもつポリマ  
ーはHAの高膨潤性混合架橋ゲルを得るのに使用  
できる。

発明者らはまたさらにHAを上記の反応性の基  
をもつ低分子量物質の存在下で架橋反応を行なわ  
せることによって有用な生成物がたやすく得られ  
るを見出した。

この発明によるもうひとつのタイプの物質はワ

セリンのような炭化水素；みつろう、ココナツオイル、ラノリンのような油または脂肪；カオリン、酸化第二鉄のような顔料、不溶性染料；ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン等のようなポリマーなどいろいろな水に不溶性物質で満たされた架橋親水性ゲルである。この型の製品中には、微粒子の充填材がゲル網目構造または発明者らが“ポリマー籠 (polymer cage)”と呼んでいるものの中に固定されている。この後者の製品はいくつかの目的に対して非常に有用なもので、以下に詳述する。

架橋ヒアルロン酸ゲルを得るには、何れかの原料からのヒアルロン酸またはその塩を希アルカリ水溶液に溶解する。HAの分子量は50,000～

$8 \times 10^6$  もしくはそれ以上であってもよい。分子量は反応に影響する。すなわち分子量が高くなればなる程、架橋ゲルは生成しやすい。

反応混合物におけるアルカリ濃度は 0.005M～0.5M もしくはそれ以上である。この下限は、媒体のpHが9より低くならないことが必要であるこ

まりHA/DVS比は、HAの架橋ゲルの膨潤率を制御するのに簡便に使うことができるということである。この比率が増加すれば高度に膨潤したやわらかなゲルが生成し（膨潤率は約4,000またはそれ以上）、一方この比率が減少すれば膨潤率の小さいかたいゲルが得られる。一般にHA/DVSの重量比は15:1～1:5またはそれ以下が好ましい。

架橋反応は通常室温すなわち約20℃で行なわれる。しかし所望によりこの温度以下でも以上でも実施できる。しかし次のことに留意すべきである。すなわちHAはアルカリ水溶液において、高温では比較的急速に分解することがあり、かような分解が起こると、分子量が低下して得られるゲルの特性に影響を与えるときがある。

この架橋反応は比較的高速であり、したがってHA濃度が十分に大きく、HA/DVS比が小さいとき通常数分後には強固なゲルが形成される。しかし反応混合物におけるHA濃度が低くてもゲル形成はDVS添加後通常5～10分で開始される。

とから規制され、上限はアルカリ溶液中のHAが加水分解されないように規制される。通常アルカリ濃度が小さくなると膨潤率の大きなゲルが生成するが、これはおそらくDVSの少量が架橋反応に使われるからであろう。

出発溶液中のHAの濃度は1～8重量%またはそれ以上にいろいろ変えることができる。濃度が1重量%以下であればいくらHA/DVS比が小さくても架橋ゲルは得られない。またこの濃度が高すぎると溶液の粘度が高くなりすぎ扱いにくくなる。HA濃度はゲルの膨潤挙動に大きく影響を与える（第1図）。膨潤率-HA濃度依存性曲線の形は種々のHA/DVS比に対して本質的に同一であるが、このHA/DVS比が小さくなればなる程、すなわち反応混合物にDVSがより多量あるとき、出発混合物中のHAの濃度が同じ溶液であっても架橋ゲルの膨潤率は低くなることが見い出された。

本発明者らは反応混合物中のHA/DVS比がまた別のパラメータであることを見い出した。つ

本発明者らはたいていの場合架橋反応が完了するには一時間あれば十分であることを見い出した。

HAの架橋ゲルの膨潤率を制御するもう1つの方法として、反応混合物に中性塩を加えることが挙げられる。本発明者らは、アルカリ金属の塩化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩のような水に可溶性の中性塩の存在下で得られるゲルの膨潤率はその塩の濃度が増加するにつれて減少することを見出した。塩は、その性質や反応混合物中のHA溶解度に及ぼす効果に依存するが、20重量%濃度までの、またはそれ以上の濃度で用いることができる。

他の親水性ポリマー類の架橋ゲルを得るのに、HAに対するのと同じ反応条件を用いることができる。これらのゲルの膨潤率は、そのゲル構造中にHAを結合させることにより簡便に制御できる。この混合ゲルを製造する場合、そのポリマー混合物の組成は所望の架橋ゲルの膨潤率によって広範囲に変化させることができる。反応混合物のHAの好ましい含有率は5～95重量%である。

不活性物質を充填したHA、もしくは他のポリマーの架橋ゲル、または混合架橋ゲルは、DVSを添加する前に反応混合物の中に不活性物質を混合させることにより得られる。これらの不活性物質は水に不溶性の液体または固体が好ましい。これらの物質の例としてはワセリンやカオリンがある。この充填された架橋ゲルを得るためには、選択された不活性物質（ゲルの所望の特性を考慮して選択されるのであるが）を、HAもしくは他ポリマー、またはHAと他のひとつもしくは複数のポリマーとの混合物をアルカリ溶液に乳化または懸濁させ、次いでDVSがその混合物に加えられる。DVSの量と反応の他のパラメータは、ゲルの要求される特性に応じて選択される。ゲル中の充填材の比率は広範囲にわたって変えることができ、ポリマーと充填材との合計重量から計算して1~95重量%であり、5~90重量%が好ましい。

医薬、染料、および巨大分子網目構造に共有結合できる他の物質のごとき低分子量物質を含む架橋ゲルは好ましくはDVSを添加する前にHA溶

出した。

HAは、人体に導入されたとき免疫や他の反応を起こさない意味で生理学的に認可しうるポリマーとして知られているので、架橋HAゲルはいろいろな医薬用途に使用できる。他のポリマーまたは低分子量物質によって改質された架橋HAゲルは医薬分配物質として使用できうる。たとえば発見者らは架橋HA中に導入されたヘパリンはその抗プロトロンビン活性を維持していることを見出した。本発明者らは、HAの架橋ゲルは、その中に分散させた低分子量物質の放出を遅らせるが、そのゲルの巨大分子マトリックスとは共有結合しないことを見出した。

架橋ヒアルロン酸（HA単独ポリマー又は他のポリ陰イオン系もしくは中性のポリマーとの共重合体）の構造は、分子籠（molecular cage）を形成する。この籠内にはいろいろな薬学的又は生理学的に活性な親水性又は疎水性の分子を分散させることができる。かくのごとくこの籠は、いろいろな大きさのこれらの物質の貯蔵庫を構成する。

液またはHAと他のポリマーとの混合溶液に上記物質を加えることによって得られる。上記物質の1つの例としては食品や医薬製剤の用途用にFDAが認可した物質のカルミン酸があげられる。

DVSとの架橋反応に関与するのはおそらく、カルミン酸分子のグルコシド成分であろう。この型の改質架橋ゲルを得るために非常にたくさんの物質が適用できることを理解すべきである。これらの物質のひとつの特徴は、DVSに対し反応性の活性水素原子をもつ化学基を有していることである。反応に使用されるこれら低分子量物質の量は、ゲル中でのその物質の所望レベルに左右される。この量は、ゲル中に含まれるポリマー含量に基づいて、その1~99重量%の範囲であってよく、好ましくは5~90重量%である。

本発明により得られる架橋HAゲル及び混合架橋ゲルには多くの用途がある。本発明者らはこれらの高度に膨潤したゲルが化粧品製剤に非常に有用であり、これらの製剤における水分保持成分、または水分分配成分として考えられることを見い

この分子籠内に保持された物質は拡散により籠外へ放出される。この放出過程は、排除体積効果や分子籠の細孔の大きさなどの要因及びポリマーの網目構造とそこに保持された物質との分子間相互作用により制御される。かくのごとくこの分子籠は、医薬や他の物質を皮膚や他の組織へ制御して分配するための貯蔵庫を形成する。

また架橋HAゲルにはもうひとつの特性があり、これによってこのゲルは医薬分配機構として極めて有用になると考えられる。これらのゲルの水中での膨潤率は溶媒中の塩濃度に大きく依存し、塩濃度が増加するに伴い、数倍減少する。このことは水中で膨潤するゲルは体内に導入されれば大きく縮み（体液や組織には正塩が含有されているため）、その結果、そのゲル内保持物、たとえば混入された医薬が体内組織へ分配されることを意味する。

種々の物質を充填した架橋ゲルは化粧品製剤にも使用できる。たとえばワセリンを入れたゲルを化粧品製剤に使用すると、ワセリン含有製剤に通常見



うけられる不快なべとついた感触がないという利点がある。

## (二) 実施例

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明する。ここで、特別に断わらないかぎり、与えられる量は重量単位である。なおこの発明の特許請求の範囲は以下の実施例により限定されるものではない。

### 実施例 1

この実施例では HA の分子量をいろいろ変化させたときの架橋反応に及ぼす影響について示してある。

雄鶏のとさかから得られたヒアルロン酸ナトリウム (0.15 M の食塩溶液の固有粘度  $[\eta]$  3850、分子量約  $2.5 \times 10^6$ ) 0.3410g を 0.2M の水酸化ナトリウム水溶液 8.1840g と混合し、30 分間攪拌して 4 重量% 濃度の溶液とした。その後その溶液に攪拌しながら DVS 0.0721g を加えた。HA/DVS の重量比は約 4.7 であった。約 15 分後には強固なゲルが形成された。このゲルは 1 時間放置し

この結果 HA の加水分解が生じた。このポリマーの固有粘度  $[\eta]$  は 1064 で約  $0.5 \times 10^6$  の分子量に相当する。上記で用いた HA/DVS 比では、このポリマーから架橋ゲルは得られなかった。

上記の分解した HA を用い、HA/DVS 比を約 2 にして試験を繰返した。この結果水中での膨潤率が 2910 の架橋ゲルが得られた。

### 実施例 2

この実施例はアルカリ濃度の HA の架橋反応に及ぼす影響について示してある。

分子量約  $3 \times 10^6$  の HA の試料を 0.2M 水酸化ナトリウム水溶液の計算量に溶解し、4 重量% 濃度の粘性溶液を得、これに HA/DVS 比が約 5:1 になる量の DVS を加えた。その後実施例 1 と同様にして架橋と処理を行なった。水中における膨潤率が 990 である架橋ゲルが得られた。

次にアルカリ濃度を 0.01 M として試験を繰返した。水中での膨潤率が 3640 のゲルが得られた。このように反応混合物中のアルカリ濃度が減少すれば、水中における膨潤率が著しく大きいゲルが

た後蒸留水 1L 中にうつされ、一晩中放置して膨潤させた。その後水中ではげしく攪拌してゲルを小さくくだし、それを口過し次いで数回水洗し、無色透明の粒子が得られた。このゲルの膨潤率を測定するために、約 1g の試料にグラスフィルターを用いて約 2 時間 3,000rpm の速さで遠心分離機にかけた。次いでフィルター上に残った粒子を、1 N の硫酸 2ml で 3 時間、95~98°C で加水分解した。得られた透明の溶液を冷却し、1N の水酸化ナトリウム水溶液で中和した後、グルクロン酸含有量がカルバゾール法 (ヘクスロン酸類の自動定量法、アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry)、2 517-558 [1965]) で測定された。最初に生成した前記ゲルの HA 含有量を計算した。その膨潤率を  $100/[HA]\%$  として表わした。ここで  $[HA]\%$  とは膨潤ゲル中の HA の重量% である。得られたゲルの水中での膨潤率は 820 であった。

次に、HA のアルカリ溶液を 24 時間室温に保持する点を除いては上記と同様の試験を繰返した。

生成する。

### 実施例 3

この実施例は、出発混合物中における HA 濃度の変化が、得られるゲルの膨潤挙動に及ぼす影響について示してある。

0.2M 水酸化ナトリウム水溶液中の HA ナトリウム濃度がそれぞれ 2.0、2.5、3.0、3.5、

4.0、5.5、8.0 及び 10.0 重量% であるヒアルロン酸ナトリウム溶液を 8 種類調製した。それぞれの溶液に計算量の DVS を HA/DVS 重量比が約 1 (モル比で約 0.33) になるように加えた。架橋ゲルが上記実施例と同様に得られ、次いで処理した。膨潤率がそれぞれの試料について測定され、出発の HA 濃度に対してプロットした。結果を第 1 図に示す。

### 実施例 4

この実施例は、いろいろな HA/DVS 比が、得られるゲルの膨潤率に及ぼす影響について示してある。

0.2M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて 4.0 重

重量%濃度のヒアルロン酸ナトリウム溶液を6つ調製し、それぞれの溶液にHA/DVS比が0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5及び2.0 mol/mol になるように計算量のDVS量を加えた。架橋ゲルが得られ、得られたゲルは先の実施例で述べたのと同様の方法で処理された。それぞれの試料について膨潤率を測定し、混合物中のHA/DVS比に対してプロットした。その結果を第2図に示す。

#### 実施例5

この実施例は反応混合物に添加した塩化ナトリウムが、架橋ゲルの膨潤率に及ぼす影響について示してある。

上記方法に従って2つのHA架橋ゲル試料を調製した。0.2M水酸化ナトリウム水溶液中のヒアルロン酸ナトリウムの濃度は、4重量%であった。HA/DVS比は約5:1、反応時間は1時間であった。2番目の反応混合物に、塩濃度が1.0モル濃度になる量で塩化ナトリウムを加えた。一番目のゲルの膨潤率は2380であり、一方無塩塩を添加して得られたゲルの水中での膨潤率は650であ

ある。

#### 実施例7

この実施例はDVSを使用したキサンテンゴムの架橋反応について示してある。

風乾したキサンテンゴム(ケルザン(Kelzan, 登録商標)、ケルコ(Kelco)社製) 0.4935gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液11.3gに溶解し、4重量%濃度の溶液を得た。この溶液に0.0718gのDVS(ポリマー/DVS重量比が約7:1)を加えた。反応混合物を室温で1時間放置した。最終的に得られた架橋ゲルを大量の水の中にうつし、一夜放置して膨潤させた。その後細かくだし、丹念に水洗した。上記実施例に記載した、重量法によりゲルの膨潤率を測定したところ526であった。これは同じ条件下で得られたHAの架橋ゲルのそれよりはるかに小さい値である。

#### 実施例8

この実施例は陽イオン性の水溶性セルロースポリマーにDVSを使用した架橋反応について示してある。

った。

#### 実施例6

この実施例は、ヒドロキシエチルセルロースのDVSを使用した場合の架橋反応について示してある。

風乾したヒドロキシエチルセルロース(セロサイズ(Cellosize)QP-100000(登録商標)、ユニオンカーバイド(Union Carbide)社製) 0.4312gを0.2N水酸化ナトリウム水溶液10.3gに攪拌しながら溶解し、4重量%濃度の溶液とした。この溶液にDVS 0.0855g(ポリマー/DVSの重量比約5:1)を攪拌しながら加え、混合物を1時間室温で放置した。その後実施例1と同様の処理をして架橋ゲルを得た。このゲルの中のポリマー濃度と膨潤率とを測定するため、このゲルから試料分を秤取し、アセトン中に入れ、1夜放置し、その後アセトンで数回洗浄した後一定重量になるまで50℃で減圧乾燥した。この得られたゲルの膨潤率は43であり、同じ条件下で得られるHAの架橋ゲルのそれよりかはるかに小さい値で

ヒドロキシエチルセルロースを化学的処理して得られる陽イオン性セルロースポリマー(ポリマーユーケアジェイアル(polymer Ucare JR, 登録商標)、ユニオンカーバイド社製) 0.5483gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液13.71g中に溶解して4重量%濃度の溶液とし、これにDVS 0.0849g(ポリマー/DVS比が約6.5:1)を加えた。反応混合物を室温で1時間放置した後、得られたゲルを前述のように処理して分析した結果、水中でのゲル膨潤率が388であった。これは同じ条件下で得られるHAの架橋ゲルのそれより著しく小さい値である。

#### 実施例9

この実施例は、DVSを使用したカルボキシメチルセルロースの架橋反応について示してある。

カルボキシメチルセルロースのナトリウム塩(9H 4F, ハーキュルス(Hercules)社製) 0.4703gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液11.76g中に溶解させ、4重量%の溶液とし、これにDVS 0.0651g(ポリマー/DVS比が約7:

1)を加えた。反応混合物を室温で1時間放置し、得られたゲルを上記実施例と同様に処理し分析した。このゲルの水中での膨潤率は893であった。これは他のセルロース系ポリマーより得られたものと比べて大きい値であるがしかし、HAの架橋ゲルに比べると小さい値である。

#### 実施例10～13

これらの実施例は、HAとカルボキシメチルセルロースとで作った混合架橋ゲルとその中のHAの濃度がゲル全体の膨潤率に及ぼす影響について示す。

各実施例において、ヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロース 9H 4Fとを両者を特定の比で秤取し、0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液に溶解した。いずれの場合も合計ポリマー濃度が4重量%であり、ポリマー/DVS比が約5:1であった。上記実施例と同様の方法でゲルを作製して処理した。ゲル中のポリマー含量は、加水分解物中のヘキサミンの濃度を(グルクロン酸のかわりに)公知の方法(微量分析におけるアミ

ノ糖類の迅速定量法、アナリティカル・バイオケミストリー (Analytical Biochemistry) 15, 167-171 [1966])で測定されたこと以外実施例1と同様にしてゲル中のポリマーの濃度が測定された。ポリマー含量はHAの濃度と2つのポリマーの比率とから計算された。

実施例番号	出発混合物のHA含量 (単位:重量%)	水中での膨潤率
10	70	8196
11	50	6757
12	20	1117
13	0	623

上記データから明らかなように出発混合物中のHA含量が増加すると生成したゲルの膨潤率が増加する。

#### 実施例14

この実施例はHAとコラーゲンとから得られた混合架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム 0.2531 gを0.1Mの水酸化ナトリウム水溶液 2.5 ml中に溶解させた。一方、ヒトのヘその緒から得られたコラーゲン 0.063 gを0.1M酢酸溶液 2.3 ml中に溶解させ、両溶液を混合した。合計ポリマー濃度は6重量%濃度であり、HA/コラーゲンの重量比は約4:1であった。この混合溶液中に乾燥したKCl 0.05 gを溶解させ、DVSを、ポリマー/DVSの重量比が約5:1の割合になる量で反応混合物に加え攪拌した。反応混合物を室温で1時間放置し、得られたゲルは上記実施例と同様の方法で処理された。膨潤ゲル中のポリマー含量はグルクロン酸分析法によって測定されるHA含量から計算された。強固な、弾力性のあるゲルが得られ、その水中での膨潤率は321であった。

#### 実施例15

この実施例は、実施例14に記載のゲルよりもコラーゲン含量が多くかつ膨潤率の低いHA-コラーゲンの混合架橋ゲルについて示してある。

ヒアルロン酸ナトリウム 0.2544 gを0.2M水酸

化ナトリウム水溶液 3.5 ml中に溶解させた。一方ヒトのヘその緒から得られたコラーゲン 0.1192 gを0.2M酢酸溶液 1.5 ml中に溶解させ、両溶液を混合した。全ポリマー濃度は7.5重量%であり、HA/コラーゲンの重量比は約2:1であった。この混合溶液に塩化ナトリウム 0.05 gを溶かし、さらにDVS 0.1189 gを加えた。このときポリマー/DVS比は重量比で約3:1であった。ゲルが生成し上述の実施例と同様の処理をした結果、膨潤率35の強固なゲルが得られた。

#### 実施例16

この実施例は、HAとヘパリンとの混合架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム 0.2968 gを0.2Mの水酸化ナトリウム水溶液 6.92 g中に溶解させ、4重量%濃度の溶液とし、これにヘパリン 0.0503 gを加えた。このとき全ポリマー量に基づいて計算されたヘパリン含量は、14.5重量%であった。この反応混合物にDVS 0.0590 gを混合物に攪拌しながら加えた。この反応は室温で1時間

行なわれた。得られたゲルは上記実施例と同様に処理され、そのゲルの膨潤率は 825であった。

#### 実施例 17

この実施例はワセリンを充填したヒドロキシエチルセルロースの架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒドロキシエチルセルロース 0.5292g を 1Mの水酸化ナトリウム水溶液 10.58gに溶解させ、その溶液に白色のワセリン 1.058g を攪拌しながら加えた。ワセリン／ポリマーの重量比は約 2であった。DVSの 0.1771gを 1Mの水酸化ナトリウム水溶液 1.0gに加えた溶液を激しく攪拌しながら上記乳濁液に加えた。反応混合物を室温で 1時間放置した後、得られたゲルは上記実施例と同様に処理された。ゲル中のワセリン含量を調べるためにゲル試料を 1N硫酸 2ml中に 3時間 95℃で浸漬した。その後この反応混合物に 1N水酸化ナトリウム水溶液 2mlを加えた後、キシレン 4mlでワセリンを抽出した。抽出液を減圧蒸発し、残留物の重量を測定した。ゲル中の計算ワセリン含量は 6重量%であった。

0.2N水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 4重量%のポリマー溶液とした。その溶液にカオリン 0.5400gを攪拌しながら加えた。得られた懸濁液に DVS 0.5400gを加え、反応混合物を室温で 1時間放置した。生成したゲルを多量の水にうつし、膨潤させた。その高膨潤ゲルを針つきの注射器から押し出して小さな粒状にくだいた。粒状物は丹念に水で洗われた。乳白色の高膨潤度の粒状物が得られた。ゲル中の固体成分の含量は 0.064重量%であった。

#### 実施例 20

この実施例は巨大分子網目構造に共有結合したカルミン酸を含むHAの架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム 0.20gと、カルミン酸 0.04gを 0.2M水酸化ナトリウム水溶液 5.0ml中に溶解し、約 4重量%のポリマー溶液とした。次にこの溶液に DVS 0.40g(ポリマー／DVS比が 1:2)を加えた後反応混合物を室温で 1時間放置した。得られたゲルは上記例と同様

#### 実施例 18

この実施例はワセリンを充填したHA-カルボキシメチルセルロースの混合架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム 0.1830gと、同量のカルボキシメチルセルロースとを 0.2Nの水酸化ナトリウム水溶液 9.1g中に溶解し、4重量%のポリマー溶液とした。この溶液にワセリン 0.3660gを攪拌しながら加え得られた乳濁液に DVS 0.0730gをはげしく攪拌しながら加えた。ポリマー／DVS比は約 5:1であった。反応混合物を 1時間室温で放置した後、得られたゲルは前述の実施例と同様の処理をした。ヘキサミン含量より測定されたゲルの膨潤率は 738であり、前記実施例と同様にして定量されたワセリン含量は 0.1重量%であった。

#### 実施例 19

この実施例は、カオリンを充填したHAの架橋ゲルについて示してある。

乾燥したヒアルロン酸ナトリウム 0.2700gを

で 1時間放置した。得られたゲルは上記例と同様の処理をした。

赤色透明なゲル粒状物が得られ、丹念に水洗しても色は消えなかった。重量分析法により測定された水中での膨潤率は 115であった。

#### 実施例 21

この実施例はHA架橋ゲルの膨潤挙動に及ぼす水中の塩濃度の影響について示してある。

0.2M水酸化ナトリウム水溶液中のHA濃度が 4重量%、HA／DVS比が 5:1で 1時間室温で放置して前記実施例と同様にしてひとつの架橋HAゲルを得た。ゲル粒状物を水と、異なった塩化ナトリウム濃度の水溶液中に入れて膨潤率を測定し、以下に示す結果を得た。

NaCl 濃度, M	膨潤率
水	990
0.05	413
0.15	384
0.50	219
1.00	176

実施例 2.2

この実施例はHA-ヘパリン混合架橋ゲルの生物活性を示す。

実施例 16 に従って調製されたHA-ヘパリン混合架橋ゲルの微粒子を架橋HAの濃度が 0.01、0.02 及び 0.04 重量%になる量で、正常なヒトの血漿に混合したところ、これらの試料の凝固時間はそれぞれ 1.4、2.8、及び 5.0 倍に増加した。ヘパリンを含まない架橋ゲル粒状物の同じ濃度のものは凝固時間に影響を与えなかった。

これらのデータは、ヘパリンが架橋ゲル構造中に混入されてもトロンビンで触媒されるフィブリン形成を阻害する能力を失わないことを示している。

実施例 2.3

この実施例はHA架橋ゲル粒状物を含んだ製品が、化粧品製剤として有用であることを示す。

次に示す反応条件下で実施例 1 と同様の方法によりHAの架橋ゲルを調製した。すなわち、0.2

M水酸化ナトリウム水溶液中のHA濃度が 3.0 重量%、HA/DVS比が約 3:1 及び室温で 1 時間である。ゲルは多量の水中に一夜放置され膨潤させられた。その後 18-1/2 ゲージの針付注射器より押しだして小さな粒状にくだき、さらに 25-1/2 ゲージの針付注射器より押し出してくれた。粒状物は徹底的に水洗された。無色透明の粒状物が得られた。そのゲルの膨潤率は 1980 であった。口通されたゲル粒状物中のHA濃度は 0.025 重量%であった。これらの粒状物は、高分子量のポリエチレンオキサ이드（ポリオックス（Polyox, 登録商標）、コーギュラント（Coagulant, ユニオンカーバイド社製）と水溶性ヒアルロン酸ナトリウム（ヒラダーム（Hyladerm, 登録商標）、バイオマトリックス インコーポレーション（Biomatrix, Inc.）製）との下記組成の混合物に用いられた。

成 分	混合物 1	混合物 2	混合物 3	重量%
架 橋 ゲ ル	90	80	75	
ヒラダーム（登録商標）（ヒアルロン酸ナトリウムの 1% 水溶液）	5	2	14	
ポリオックス（登録商標） 1% 水溶液	5	4	11	
水	—	14	—	

これらすべての配合物は成分の性質が異なっているにもかかわらず外観は均一な粘性液体であった。皮膚に塗布すると、それらは非常にしっとりとしたすべすべした感触を与える。

実施例 2.4

この実施例は本発明によるHAの架橋ゲルを含んだモイスタライジング・アイクリーム（moisturizing eye cream）を示す。

A. カーボポール（Carbopol, 登録商標）940（B. F. グッドリッチ（Goodrich）社製）	0.4
混合物 # 3（実施例 23）	10.0
水	83.3
B. ボルボ（Volpo, 登録商標）- 3（クロダインコーポレーション製）	1.0
ボルボ（Volpo, 登録商標）- 5（クロダインコーポレーション製）	0.5
ソルラン（Solulan, 登録商標）	1.8
C-24（アマコールシーオー（Amerchol Co.）製）	
ローバン（Roban, 登録商標）	1.0
クロダモール（Crodamol, 登録商標）PMP（クロダインコーポレーション製）	0.5
グルカム（Glucan, 登録商標）	0.7
E-10（アマコールシーオー製）	

防 腐 剤	0.3
C. トリエタノールアミン	0.4
香 料	0.1

この配合物は次に示すように段階的に調製される。パートAの混合物は、水にカーボボールを分散させて調製され、次いで他の成分に加えて攪拌される。パートBの成分はすべて一緒に混合し70℃に加熱した。パートA調製物とパートB調製物とを和し、次いでトリエタノールアミンと香料を加えた。出き上がったクリームは安定であり、なめらかであった。そして良好な湿分付与性能を有し、皮膚にすぐれた感触を与えた。

#### 実施例 2.5

この実施例は、架橋ゲルにワセリンを充填したものをハンドローションに用いた実施例を示す。

	ルのポリエチレングリコールエーテル)
ボルボ (登録商標) - 3	オレス-3 (Oleth-3、オレイルアルコールのポリエチレングリコールエーテル)
ソルラン (登録商標) C-24	コレス-24 (Choleth-24、コレステロールのポリエチレングリコールエーテル)
クロタモール (登録商標) PMP	(プロボキシ化したミリスチルプロピオネート) PPG-3 ミリスチルエーテルプロピオネート
グルカム (登録商標)	メチルグルセス-10

	重量%
A. カーボボール (登録商標)	0.25
カルボキシメチルセルロース 9H 4F、の 1% 水溶液	2.00
実施例 18 の製品	60.00
水	36.70
B. ロバーン (Robane、登録商標)	0.20
コッキン (Cochin、登録商標)	0.10
防 腐 剤	0.30
C. トリエタノールアミン	0.25
香 料	0.20

この配合物は上記実施例に記載した同様の方法で調製された。出き上がったローションはきわめて潤滑性に富んでおり肌につけた際ベとつきが感じられなかった。

実施例 2.4 と 2.5 に登録商標で示された成分は下記のとおりである。

ボルボ (登録商標) - 5    オレス-5 (Oleth-5、オレイルアルコール

E-10    (Methyl gluceth-10、メチルグルコースのポリエチレングリコールエーテル)

#### 実施例 2.6

この実施例は架橋ヒアルロン酸のマトリックス中に分散された低分子量物質の緩徐な離散現象について示してある。

この実験では、放射性同位元素でラベルされた物質 (以下ラベル物質と略す)、すなわちヒドロキシトリブタミンビノキソレート、5-(1,2-<sup>3</sup>H(N))-, が使用された。この物質の 40 μM の 2 つの 5 μl 溶液に、HA の架橋ゲル粒状物 (ゲル中の HA 濃度が 0.131%) 5 μl 及び水 5 μl とをそれぞれ混合した。この両混合物を別々の透析管にうつし 0.15 M 塩化ナトリウム水溶液中で 24 時間透析した。架橋ゲルとラベル物質との混合物の方には、ラベル物質の出発量のうちの 54% が透析管内に残っていた。しかし一方水にラベル物質を混ぜた方ではわずか 10% しか残っていなかつ

た。このことはHAの架橋ゲルは低分子化合物の  
 離散速度を5倍以上も遅延させることを如実にあ  
 らわしている。

もちろんこの発明は、この発明の思想及び範囲  
 からはずれることなしに変化させることができる。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例3で述べた、出発溶液中におけ  
 るHAのいろいろな濃度に対して、HA/DVS  
 の重量比が約1で室温下1時間反応させて得られ  
 るゲルの膨潤率を示すグラフ、第2図は実施例4  
 で述べた、HA/DVSのいろいろなモル比に対  
 して出発溶液中のHA濃度が4重量パーセントで  
 室温下1時間反応させて得られるゲルの膨潤率を  
 示すグラフである。

代理人 弁理士 野 河 信 太 郎



第 1 図

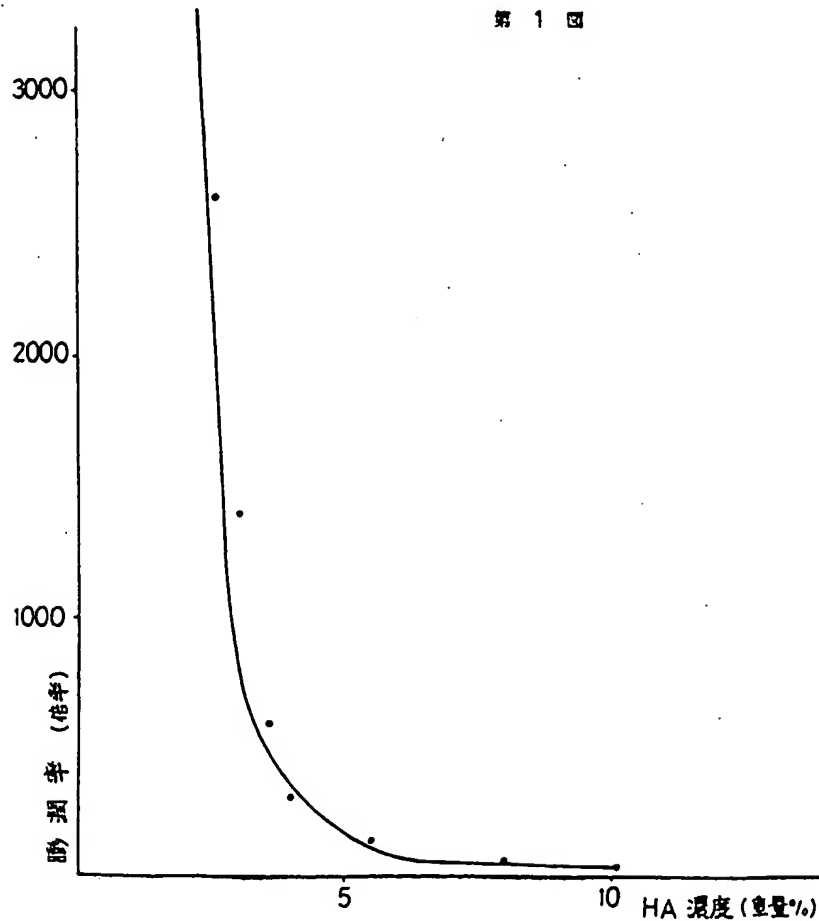


図 2

